

Progetto SOILSINK

Linea 4, UO 8 – prof. Stefano Grego

Relazione I anno di attività

Il gruppo di ricerca di Biochimica del Suolo dell'Università degli studi della Tuscia, coordinato dal prof. Stefano Grego studia le attività enzimatiche del suolo ed il loro ruolo nel ciclo del carbonio e dei nutrienti.

Gli enzimi del suolo sono i mediatori di tutti i processi che caratterizzano il metabolismo del suolo ed hanno un ruolo chiave nell'interazione tra i processi biologici, chimici e biochimici.

L'attività del gruppo di ricerca mira ad utilizzare alcuni enzimi chiave dei cicli di carbonio, azoto, fosforo e zolfo come indicatori della qualità del suolo in risposta al sistema di gestione. Il tipo di vegetazione e relativi residui o prodotti radicali che pervengono al suolo, infatti, influenzano fortemente il livello dell'attività enzimatica nel suolo e, viceversa, variazioni a carico degli enzimi possono indicare cambiamenti quali-quantitativi avvenuti a carico della sostanza organica o del *pool* microbico.

Campionamento dei suoli

I suoli sono stati campionati nei siti identificati dalle unità operative del progetto: Agugliano (Ancona) e Berchidda (Sassari).

1. Agugliano: è stato effettuato un primo campionamento il 18 ottobre 2006 in cui sono stati prelevati 60 campioni di suolo. I campioni sono stati prelevati nelle due colture presenti (mais e frumento) a due livelli di lavorazione (convenzionale e non lavorato) e a due livelli di fertilizzazione (0 e 90 kg N ha⁻¹). Nelle parcelle sottoposte a lavorazione (CT) sono stati prelevati 20 campioni (2 colture x 2 livelli di fertilizzazione x 5 repliche di campo) alla profondità di 0-40 cm, mentre nelle parcelle non lavorate (NT) sono stati prelevati 40 campioni alle profondità di 0-20 e 20-40 cm (2 colture x 2 livelli di fertilizzazione x 2 profondità x 5 repliche di campo).

Il secondo campionamento è stato effettuato l'11 giugno 2007 su 24 campioni di suolo. Le analisi precedenti hanno infatti evidenziato l'assenza di una significativa variabilità spaziale ed il numero di repliche di campo è stato ridotto da 5 a 3. I campioni sono stati prelevati nelle due colture presenti alla profondità di 0-20 cm a due livelli di lavorazione (CT e NT) e a due livelli di fertilizzazione (2 colture x 2 livelli di lavorazione x 2 livelli di fertilizzazione).

2. Berchidda: è stato effettuato un primo campionamento il 5 febbraio 2007. In tale data sono stati prelevati 30 campioni di suolo nella serie vegetazionale secondo lo schema seguente: 6 campioni nel vigneto lavorato a due profondità (0-20 e 20-40), 6 campioni nel vigneto inerbito a due profondità (0-20 e 20-40), 8 campioni nell'erbaio a due profondità (0-20 e 20-40), 8 campioni nel pascolo a due profondità (0-20 e 20-40), 4 campioni nella sughereta alla profondità di 0-20 cm.

Il secondo campionamento è stato effettuato il 2 maggio 2007 su 21 campioni di suolo lungo la serie vegetazionale secondo lo schema seguente: 6 campioni nel vigneto lavorato a due profondità (0-20 e 20-40), 6 campioni nel vigneto inerbito a due profondità (0-20 e 20-40), 3 campioni nell'erbaio, 3 campioni nel pascolo e 3 campioni nella sughereta alla profondità di 0-20 cm.

Analisi biochimiche

I suoli sono stati seccati all'aria e setacciati a 2 mm al fine di rimuovere lo scheletro e le radici presenti. Il contenuto di umidità è stato portato al 60% della capacità di ritenzione idrica ed i suoli sono stati condizionati per 24 ore prima delle analisi biochimiche.

Sui suoli campionati ad Agugliano ad ottobre 2006 e sui suoli dei vigneti campionati a Berchidda a febbraio 2007 sono state determinate le attività enzimatiche riportate in tabella 1.

enzima	substrato	metodo di determinazione
α -glucosidasi	4-MUF- α -D-glucopyranoside	Fluorimetrico (Vepsalainen et al., 2001)
β -glucosidasi	4-MUF- β -D-glucopyranoside	
cellulasi	4-MUF- β -D-cellobiopyranoside	
chitinasi	4-MUF-N-acetyl- β -D-glucosaminide	
Leucina-aminopeptidasi	L-leucine 7-AMC	
Fosfatasi acida	4-MUF phosphate	
Arilsulfatasi	4-MUF sulfate	
Deidrogenasi	p-iodio-nitro-tetrazolium violet	Colorimetrico (Ladd e Butler, 1972)
Proteasi	Caseina	Colorimetrico (Garcia et al., 1997)

Tabella 1. Attività enzimatiche determinate, substrato corrispondente e metodo di analisi.
MUF: Metilumbelliferone, AMC: Amino-metil-cumarina.

Nei suoli campionati a febbraio 2007 lungo la serie vegetazionale sono stati inoltre determinati il contenuto di carbonio della biomassa microbica con il metodo della fumigazione estrazione (Vance et al. 1987) e la respirazione potenziale con misurazione della CO₂ prodotta dopo 2, 4, 7, 10, 14, 21 e 28 giorni di incubazione a 28 °C (Badalucco et al., 1992).

Principali risultati ottenuti

Sito di Agugliano - campionamento ottobre 2006

Gli enzimi considerati hanno permesso di discriminare tra i due diversi sistemi di lavorazione del suolo ed hanno dimostrato di essere sufficientemente sensibili nell'evidenziare differenze a seguito della gestione colturale (fig. 1).

Gli enzimi determinati hanno mostrato attività più elevate nello strato più superficiale (0-20 cm) con incrementi medi del 48 e del 101% rispettivamente nel frumento e nel mais (tab. 2), confermando altri risultati riportati in letteratura (Venkatesan and Senthurpandian, 2006).

L'assenza di lavorazioni ha influenzato positivamente le attività enzimatiche, in modo particolare nello strato più superficiale, dove sono stati osservati i tassi massimi di attività (tab. 2 e 3). Questo risultato riflette l'importanza della gestione dei residui colturali nel determinare le attività enzimatiche: con la lavorazione del suolo infatti i residui vengono incorporati negli strati più profondi mentre in assenza di lavorazioni i residui rimangono sulla superficie inducendo tassi di attività più elevati, in particolare nel frumento dove la trinciatura dei residui ha favorito il processo di degradazione microbica. Il sistema di semina su sodo, fornendo un habitat più favorevole alla biomassa microbica del suolo (Mendes et al., 1999), ha quindi determinato un sistema più attivo per quanto riguarda il ciclo della sostanza organica e dei nutrienti. L'incremento è stato maggiore nel suolo non fertilizzato (+112% vs. +49% nel frumento e +73% vs. +43% nel mais), suggerendo una più elevata attività di acquisizione dei nutrienti in assenza di lavorazioni e aggiunte di fertilizzanti minerali.

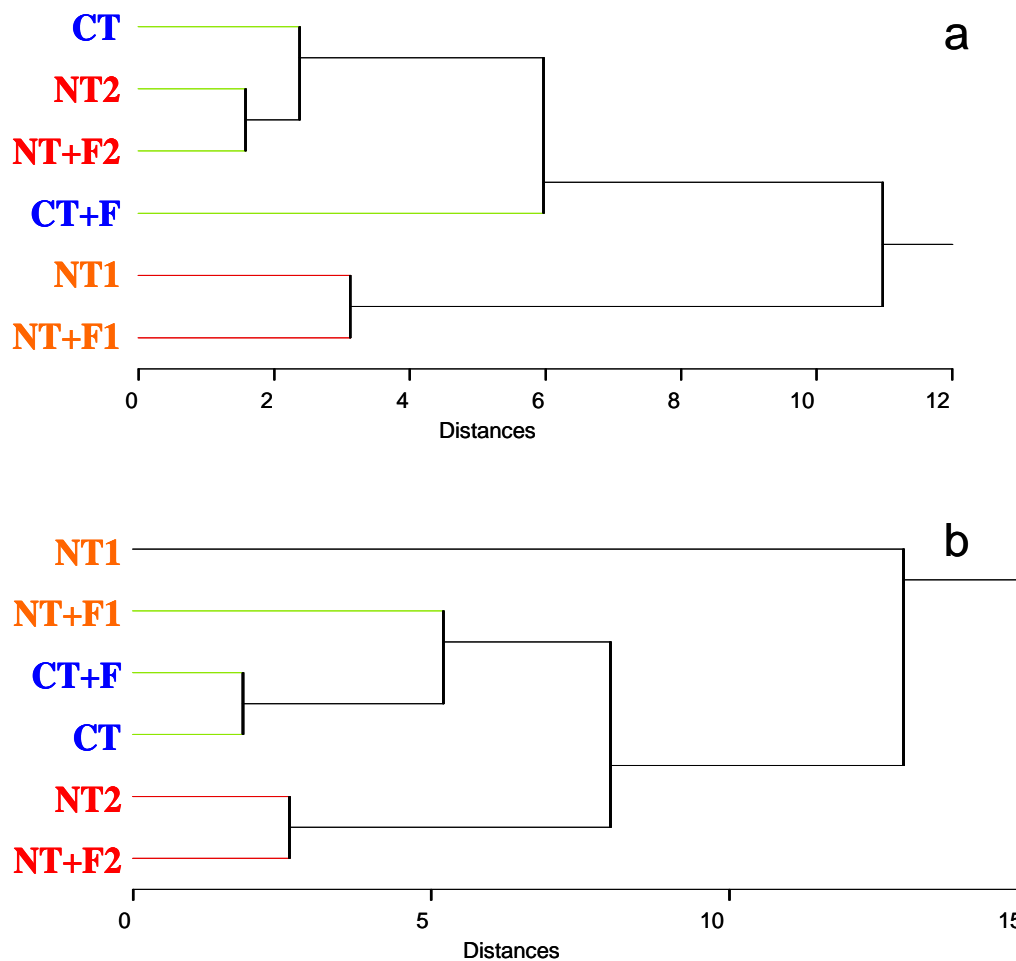


Figura 1. Dendrogrammi ottenuti sulla base dei risultati delle attività enzimatiche usando il metodo ward e la distanza euclidea (Systat 7.0, SPSS inc.) per il frumento (a) ed il mais (b). CT: lavorazione convenzionale; NT: sodo; F: fertilizzato; 1: profondità 0-20 cm; 2: profondità 20-40 cm.

Gli enzimi legati al ciclo del carbonio hanno mostrato i maggiori incrementi a seguito del trattamento NT, mentre gli enzimi del ciclo dell'azoto hanno mostrato risposte diverse a seconda della profondità di campionamento e della coltura (tab. 2).

La fertilizzazione ha influenzato positivamente le attività enzimatiche (in media +25%) solo nei suoli lavorati, mentre non ha determinato variazioni in assenza di lavorazioni. La rottura degli aggregati ha presumibilmente esposto la sostanza organica del suolo alla decomposizione (Paustian et al., 2000), che è stata ulteriormente favorita dalla disponibilità di N minerale. L'aumento a seguito della fertilizzazione è risultato significativo solo per quanto riguarda l'attività della β -glucosidasi, della cellulasi e dell'arilsulfatasi (tab. 2). Al contrario la proteasi è diminuita nei suoli fertilizzati non lavorati alla profondità 0-20 cm (tab. 2), suggerendo un *feedback* negativo della fertilizzazione minerale.

	Fosfatasi	β -glucosidasi	α -glucosidasi	cellulasi	chitinasi	arilsulfatasi	Leucina aminopeptidasi	deidrogenasi	proteasi
	nmol MUB g ⁻¹ h ⁻¹						nmol AMC g ⁻¹ h ⁻¹	μ g Tyr g ⁻¹ h ⁻¹	μ g INTF g ⁻¹ h ⁻¹
Frumento									
CT	7.1 ^a	11.1 ^a	0.6 ^a	1.1 ^a	2.6 ^a	1.7 ^a	11.1 ^{ab}	0.36 ^a	24.6 ^a
CT + F	8.6 ^{ab}	14.5 ^a	0.9 ^{ac}	1.5 ^a	3.8 ^{ab}	2.2 ^a	9.9 ^{ab}	0.36 ^a	40.4 ^b
NT1	12.5 ^b	28.3 ^b	1.7 ^b	3.0 ^b	6.1 ^d	3.8 ^c	13.3 ^b	0.70 ^{bc}	37.1 ^{ab}
NT1 + F	10.0 ^{ab}	28.9 ^b	1.2 ^{bc}	2.6 ^b	5.9 ^{cd}	3.9 ^c	12.4 ^{ab}	0.69 ^b	28.1 ^{ab}
NT2	8.8 ^{ab}	11.1 ^a	0.9 ^{ac}	1.3 ^a	4.0 ^b	2.8 ^b	7.7 ^a	0.55 ^{ac}	27.3 ^{ab}
NT2 + F	9.8 ^{ab}	15.1 ^a	1.1 ^{ac}	1.6 ^a	5.6 ^c	2.8 ^b	7.9 ^a	0.93 ^b	29.1 ^{ab}
effetti (%)									
NT (0-20)	+46*	+127***	+105***	+124***	+93***	+101***	+22	+93***	+10
NT (20-40)	+19	+2	+38	+11	+49*	+47*	-25	+107**	-9
Fert (CT)	+21	+31	+50	+44*	+43	+34	-11	-2	+64*
Fert (NT)	-5	+8	-12	-5	+12	+2	-3	+29	-13
Mais									
CT	7.1 ^b	12.2 ^b	0.54 ^b	1.49 ^{bc}	3.37 ^{ab}	2.45 ^a	6.02 ^b	0.45 ^a	34 ^b
CT + F	7.5 ^b	9.3 ^b	0.57 ^b	1.02 ^b	3.04 ^b	1.64 ^{bc}	4.83 ^{bc}	0.39 ^a	30 ^{bc}
NT1	11.7 ^a	17.9 ^a	1.02 ^a	1.92 ^{ac}	4.54 ^a	2.96 ^a	9.7 ^a	0.40 ^a	52 ^a
NT1 + F	11.3 ^a	18.9 ^a	0.91 ^a	2.38 ^a	4.68 ^a	3.24 ^a	11.7 ^a	0.45 ^a	26 ^{bc}
NT2	6.2 ^b	10.0 ^b	0.61 ^{ab}	1.25 ^{bc}	3.29 ^{ab}	2.21 ^c	1.84 ^c	0.47 ^a	22 ^{bc}
NT2 + F	6.0 ^b	10.6 ^b	0.74 ^{ab}	1.67 ^{bc}	3.32 ^{ab}	2.65 ^b	2.04 ^c	0.32 ^a	14 ^c
effetti (%)									
NT (0-20)	+58*	+74***	+74**	+73**	+44*	+81***	+97*	+21	+25
NT (20-40)	-16	-3	+22	+17	+3	+13	-64*	+18	-43*
Fert (CT)	-5	+31*	-6	+46*	+11	+50**	+25	+57	+15
Fert (NT)	-3	+6	+2	+27	+2	+6	+19	-11	-47*

Tabella 2. Valori medi delle attività enzimatiche nelle due colture. CT: lavorazione convenzionale; NT: non lavorato; F: fertilizzato; 1: profondità 0-20 cm; 2: profondità 20-40 cm. Per ogni enzima lettere diverse identificano differenze significative tra le medie ($p < 0.05$). Sono riportati gli effetti percentuali del trattamento NT alle due profondità (0-20 e 20-40 cm) e della fertilizzazione nei due sistemi lavorato (CT) e non lavorato (NT). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Sito di Berchidda - campionamento febbraio 2007

Gli enzimi del suolo hanno mostrato in generale un aumento significativo nel vigneto inerbito rispetto a quello lavorato (+100% in media), con l'eccezione della fosfatasi acida e della leucina aminopeptidasi (fig. 6).

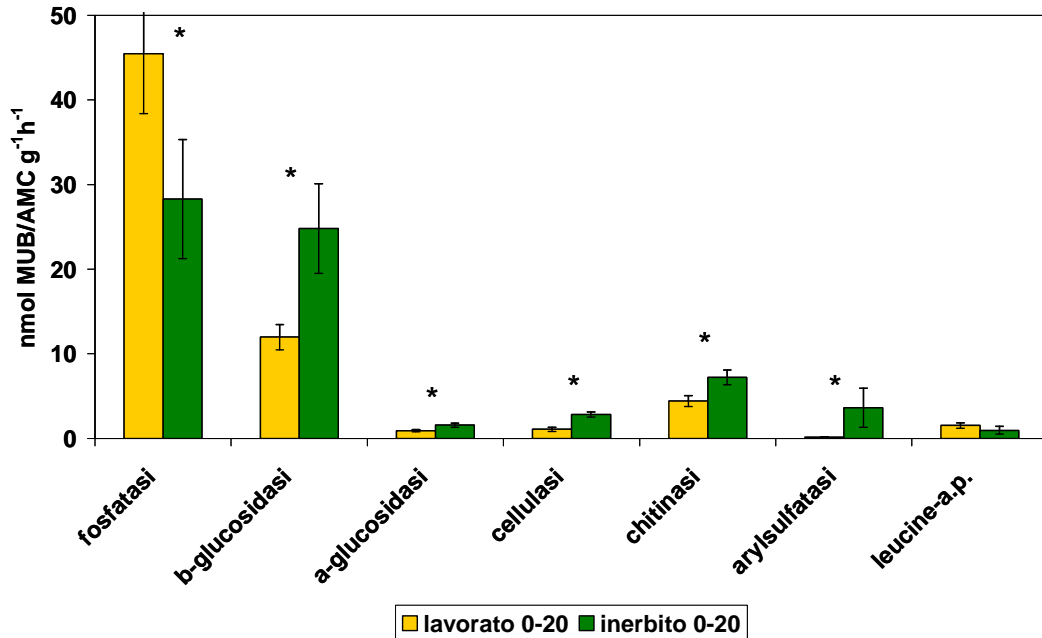


Figura 6. Attività enzimatiche dei suoli dei vigneti lavorato e inerbito alla profondità 0-20 cm. * identifica una differenza significativa tra le medie, $p < 0.05$.

L'aumento delle attività enzimatiche a seguito dell'inerbimento è tuttavia presente solo nello strato più superficiale, mentre sotto i primi 20 cm tale effetto scompare (fig. 7).

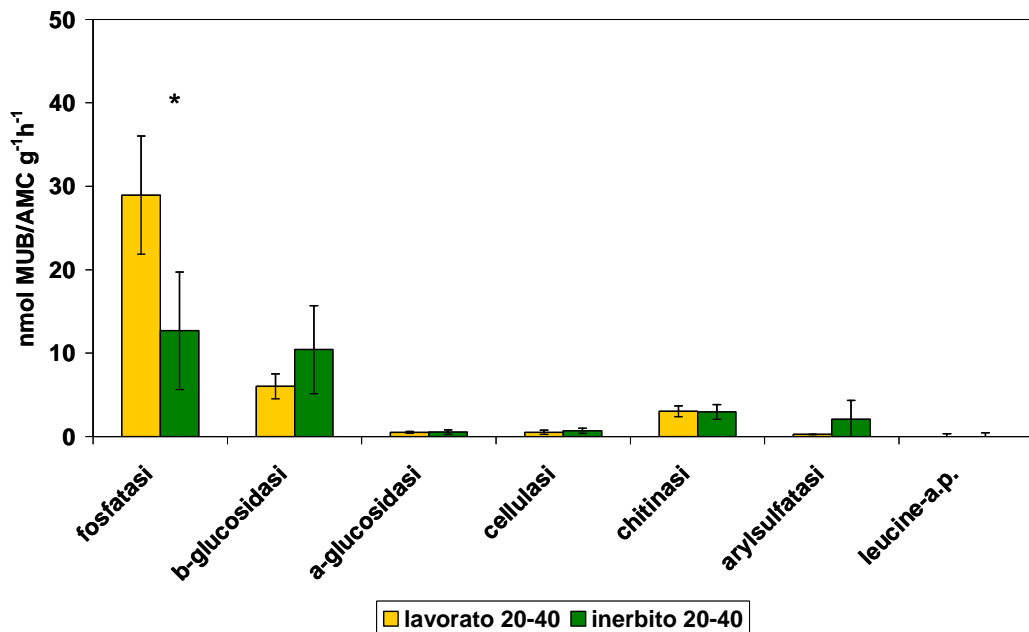


Figura 7. Attività enzimatiche dei suoli dei vigneti lavorato e inerbito alla profondità 20-40 cm. * identifica una differenza significativa tra le medie, $p < 0.05$.

L'inerbimento e l'assenza delle lavorazioni hanno evidentemente determinato un aumento degli input di sostanza organica nello strato interessato dalle radici delle piante erbacee, che può aver favorito l'attività di decomposizione, in particolare per quanto riguarda gli enzimi del ciclo del carbonio. L'aumento dell'attività dell'arilsulfatasi e della chitinasi, inoltre, può indicare una maggior presenza fungina (Bandick e Dick, 1999; Miller et al., 1998) nei suoli inerbiti.

La riduzione dell'attività della fosfatasi acida è evidente ad entrambe le profondità e tale risultato andrà analizzato in seguito anche alla luce delle modificazioni dell'attività vegetativa della coltura. Infine, come già osservato per i suoli di Agugliano, le attività enzimatiche hanno presentato una riduzione significativa a profondità maggiori di 20 cm, in media del 42% (fig. 6 e 7).

Il contenuto di biomassa microbica è risultato aumentare progressivamente passando dal vigneto lavorato alla sughereta (fig. 2), suggerendo una maggiore immobilizzazione del carbonio nelle cellule microbiche nei suoli con un minor grado di antropizzazione e soggetti a maggiori input di sostanza organica di origine sia animale, sia vegetale.

L'assenza di lavorazione del suolo e gli input di C nel pascolo hanno determinato un aumento significativo del C-biomassa rispetto al suolo dell'erbaio. E' noto infatti che i suoli dei pascoli si differenziano sostanzialmente dai suoli coltivati per il maggior contenuto di sostanza organica (Lal e Kimble, 1997). Infine nella sughereta si osserva il massimo contenuto di C-biomassa con valori 2-3 volte superiori rispetto agli altri stadi della serie.

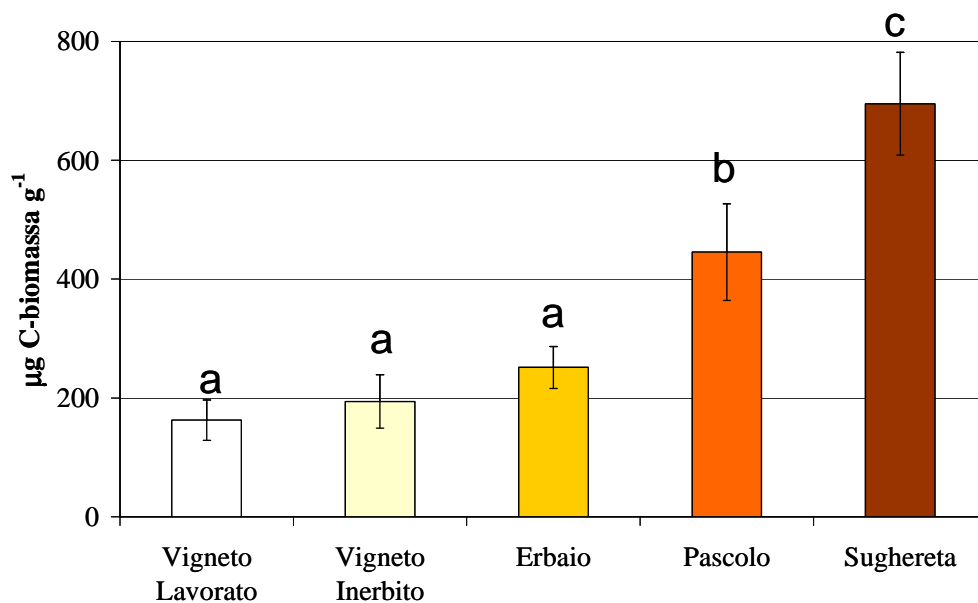


Figura 2. Contenuto di C della biomassa microbica. Lettere diverse identificano differenze significative tra le medie ($p < 0.05$).

L'attività metabolica basale della biomassa microbica è diminuita progressivamente nei suoli della serie vegetazionale passando dagli stadi maggiormente antropizzati alla testa di serie (fig. 3).

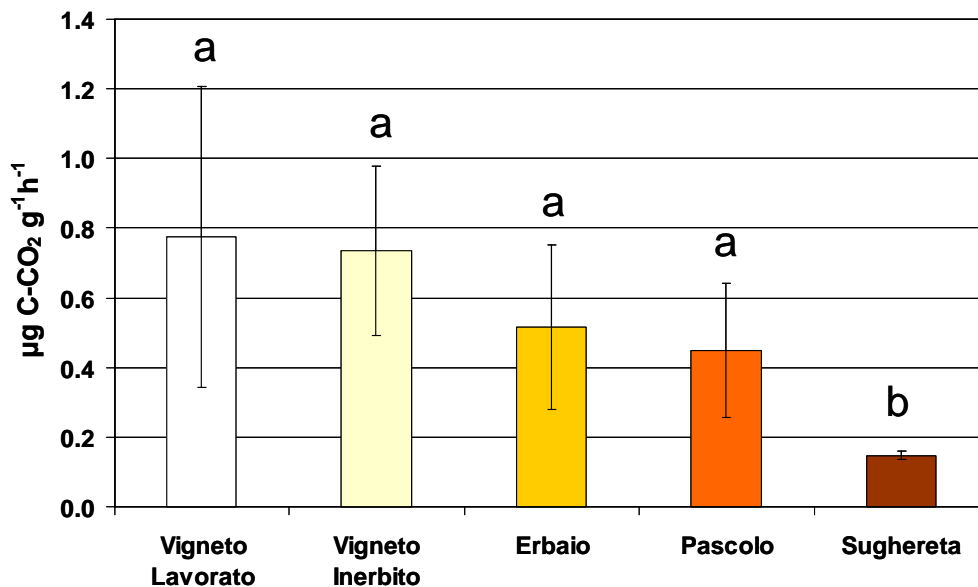


Figura 3. Respirazione basale della biomassa microbica. Lettere diverse identificano differenze significative tra le medie ($p < 0.05$).

Tale risultato suggerisce la presenza, nel suolo della sughereta, di una comunità microbica in condizioni metaboliche ottimali. Tuttavia il carbonio complessivamente mineralizzato risulta maggiore nel suolo della sughereta (fig. 4), come conseguenza di una popolazione microbica di maggiori dimensioni e non di un aumento del tasso di mineralizzazione espresso dall'attività respiratoria basale.

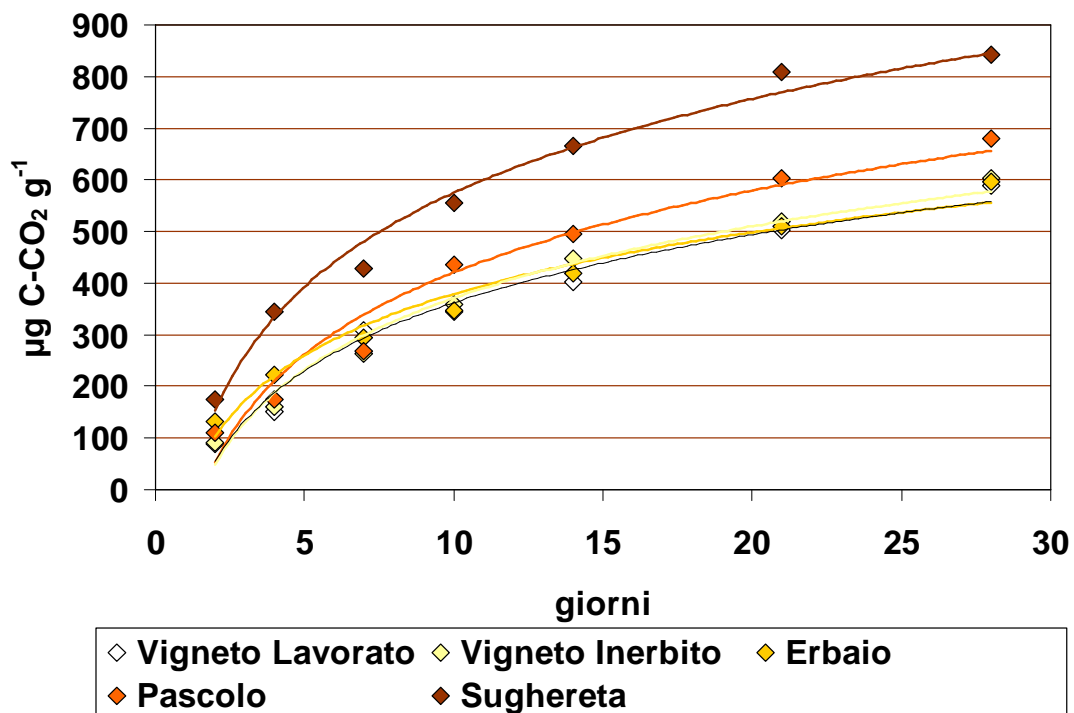


Figura 4. Carbonio mineralizzato durante 28 giorni di incubazione.

Il calcolo del quoziente metabolico (qCO_2) ha messo maggiormente in evidenza quanto riportato sopra (Figura 5).

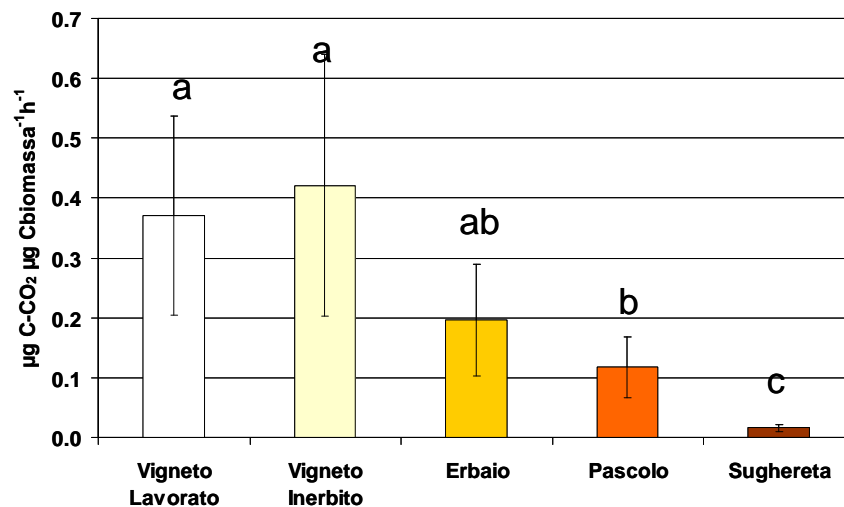


Figura 5: Quoziente metabolico della biomassa microbica. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra gli stadi della serie, $p < 0.05$.

Dilly and Munch (1998) hanno definito il qCO_2 come un valido indicatore dell'efficienza d'uso dell'energia da parte dei microrganismi. Negli stadi finali della serie vegetazionale la diminuzione dell'attività respiratoria per unità di biomassa sembra quindi essere il risultato di una migliore utilizzazione dei substrati organici disponibili. Ciò ha determinato un minor dispendio energetico e quindi una maggiore conservazione della sostanza organica in questi suoli.

Bibliografia

- Badalucco L., Grego S., Dell'Orco S., Nannipieri P., 1992. *Biology and Fertility of Soils* 14, 76-83.
- Bandick, A.K., Dick, R.P., 1999. *Soil Biol. Biochem.* 31, 1471-1479.
- Dilly O., Munch J.C., 1998. *Biol. Fert. Soils* 27, 374-379.
- Garcia C., Hernandez T., Costa F., 1997, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 28, 123-134.
- K. Paustian; J. Six, E.T. Elliott & H.W. Hunt 2000, *Biogeochemistry* 48, 147-163.
- Ladd J.N., Butler J.H.A., 1972, *Soil Biology & Biochemistry* 4, 19-30.
- Lal R., Kimble J.M., 1997, *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 49, 243-253.
- Mendes, I.C., Bandick, A.K., Dick, R.P., Bottomley, P., 1999. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63, 873-881.
- Miller, M., Palojarvi, A., Rangger, A., Reeslev, M., Kjioller, A., 1998. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 613-617.
- Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S., 1987 *Soil Biol Biochem* 19, 703-707.
- Venkatesan and Senthurpandian, 2006, *Geoderma* 137, 212-216.
- Vepsäläinen M., Kukkonen S., Vestberg M., Sirviö H., Niemi R.M., 2001, *Soil Biol. Biochem.* 33, 1665-1672.

Partecipazione a convegni

A. Lagomarsino, M.C. Moscatelli, R. Orsini, G. Iezzi, S. Grego. Impact of tillage and fertilization on soil enzymatic activities in a long term experiment: preliminary results. Poster presentation at the Third International Conference *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology & Applications*, 15-19 July 2007, Viterbo, Italy.